Untersuchungen zum Nucleinsäurestoffwechsel menschlicher Blutplättchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Roman Dries

Saarbrücken

1974

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität
des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. P. G. Scheurlen

Untersuchungen zum Nucleinsäurestoffwechsel menschlicher Blutplättchen

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von

Roman Dries

geb. am 25.2.1947 in Saarbrücken

Dekan: Prof. Dr.G.A. JUTZLER

Referenten: Prof. Dr.med. W. SCHNEIDER
Prof. Dr.rer.nat. V. ULLRICH

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 20. 5. 1974 abgelegt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	IV
I. Einleitung	1
II. Methoden	
A. Blutentnahme und Gewinnung von plättchenreichem Plasma, Thrombozytenzählung	8
B. Dünnschichtchromatographische Methoden	
1. Nachweis der Thymidin-Phosphorylierung	
a) in intakten Plättchen	8
b) in Plättchenhomogenat	9
2. Nachweis der Uridin-Phosphorylierung	9
3. Orotsäureinkorporation	9
C. Aktivitätsmessungen im Flüssigkeitsszintillationszähler	
1. Uridin- bzw. Thymidineinbau	
a) in Abhängigkeit von der Plättchenzahl	10
b) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	10
2. Einzelbestimmungen der Uridineinbaurate bei gesunden Spendern (mit konstanter Plättchenzahl und Inkubationszeit)	11
3. Uridineinbau in Gegenwart von Actinomycin D	11
4. Gesamtinkorporation des markierten Uridins in Abhängigkeit von der Zeit und der Actinomycin-Konzentration	11
5. Uridin- bzw. Uracileinbau in Gegenwart von 2-Desoxy-D-glucose	12
6. Orotsäureinkorporation	12

Seite

7. Uridineinbau in Gegenwart von cAMP 13

D. Gelchromatographische Methoden

1. Charakterisierung der neugebildeten höhermolekularen Fraktion 13

2. Enzymatischer Abbau der neugebildeten Fraktion 14

E. Materialien 15

III. Ergebnisse

1. Einbau von markiertem Uridin bzw. Thymidin in eine höhermolekulare Fraktion

a) in Abhängigkeit von der Plättchenzahl 16

b) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer 17

2. Einzelbestimmungen der Uridineinbaurate bei gesunden Spendern mit konstant eingestellter Plättchenzahl und Inkubationszeit 18

3. Uridineinbau in Gegenwart von Actinomycin D 20

4. Gesamtinkorporation des markierten Uridins in Abhängigkeit von der Zeit und der Actinomycin-Konzentration 21

5. Charakterisierung der neugebildeten Nucleinsäuren 22

6. Enzymatischer Abbau der höhermolekularen Fraktion 24

7. Uridin- bzw. Uracileinbau in Gegenwart von 2-Desoxy-D-glucose 26

8. Orotsäureinkorporation 27

9. Versuch zum Nachweis der Thymidin-Phosphorylierung 29

10. Nachweis der Uridin-Phosphorylierung

a) in intakten Plättchen 31

b) in Plättchenhomogenat 31

Seite

11. Uridineinbau in Gegenwart von cAMP 33

IV. Diskussion 34

V. Zusammenfassung 46

VI. Literaturverzeichnis 49

Abkürzungsverzeichnis

ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
cAMP	=	zyklisches Adenosin-3':5'-monophosphat
cpm	=	counts per minute (Impulse pro Minute)
DC	=	Dünnschichtchromatographie
DNA	=	Desoxyribonucleinsäure
DNase	=	Desoxyribonuclease
DOG	=	2-Desoxy-D-glucose
EDTA	=	Aethylendiamintetraessigsäure
FSZ	=	Flüssigkeitsszintillationszähler
nMol	=	Nanomol (10^{-9} Mol)
nm	=	Nanometer (10^{-9} Meter)
PAP	=	Plättchenarmes Plasma
POPOP	=	2,2'-p-Phenylenbis(5-phenyloxazol)
PPO	=	2,5-Diphenyloxazol
PRP	=	Plättchenreiches Plasma
RNA	=	Ribonucleinsäure
RNase	=	Ribonuclease
T	=	Transmission
t-RNA	=	Transfer-Ribonucleinsäure
UMP	=	Uridinmonophosphat
UDP	=	Uridindiphosphat
UTP	=	Uridintriphosphat
V_e	=	Elutionsvolumen

I. Einleitung

Seit ihrer Erstbeschreibung vor nunmehr 130 Jahren sind die Blutplättchen immer wieder Gegenstand neuer Arbeiten aus den verschiedensten Forschungsgebieten gewesen. Das hat vor allem zwei Gründe: zum ersten ist der Anteil thromboembolischer Erkrankungen - deren Ursache ja, wie es LÜSCHER bereits 1959 (a) formulierte, weitgehend auf eine Primärreaktion zwischen Gefäßendothel und Thrombozyten zurückgeführt werden kann - an der Gesamtheit der Krankheitserscheinungen im Laufe der Jahre als ganz beträchtlich erkannt worden. Auch neuere Untersuchungen zur Thrombogenese (LÜSCHER, 1970), die zusätzlich humorale und hämodynamische Faktoren diskutieren, lassen keinen Zweifel an der überragenden Bedeutung der thrombozytären Komponente. Unter allen Formen der hämorrhagischen Diathesen andererseits nehmen wiederum die thrombozytär bedingten den weitaus größten Teil ein, wenn auch die reinen Thrombopathien, d.h. Störungen der Plättchenfunktion bei normaler Zahl, verhältnismäßig selten sind. Obwohl nun seit geraumer Zeit genetisch bedingte Thrombopathien bekannt sind (z.B. Thrombopathie v. Willebrand-Jürgens, Erstbeschreibung 1926 durch v. WILLEBRAND), ist es bisher nicht gelungen, die Beziehungen zwischen genetischer Alteration und Funktions-

beeinträchtigung der Thrombozyten aufzuklären.
Zum zweiten sind die Plättchen infolge ihrer Kernlosigkeit und ihres Mitochondriengehaltes gewissermaßen als zytologisches Modell besonders interessant. Da sie keine Zellen im strengen Sinne der Definition sind, galten die kurzlebigen Thrombozyten über lange Zeit als metabolisch inerte Bruchstücke ihrer Mutterzelle, des Megakaryozyten. Die Entdeckung der im Gerinnungssystem aktiven Plättchenfaktoren (van CREVELD und PAULSSEN, 1951, 1952) hatte die Bedeutung der Thrombozyten zwar schon in neuem Licht erscheinen lassen, an der Vorstellung vom metabolisch toten Gebilde aber im Grunde nichts geändert. So hielt TULLIS noch 1953 eine Stoffwechselaktivität der Plättchen für unbewiesen, und GREENE beschrieb die Thrombozyten im Jahre 1954, als bereits die ersten summarischen Untersuchungen über Atmung urd Glykolyse eingesetzt hatten (MAUPIN, 1954), als Klumpen Nucleoprotein, dessen Aktivitäten im Gerinnungssystem die Folge von Zerfalls- und Denaturierungserscheinungen seien. Die Arbeiten der folgenden Jahre (CAMPBELL et al., 1956, 1957; BORN, 1956) brachten - z.B. durch den Nachweis von Intermediärprodukten der Glykolyse - immer mehr Hinweise auf eine merkliche Stoffwechselaktivität der Plättchen. Einen entscheidenden Schritt weiter zum Verständnis der Komplexität des Thrombozytenstoffwechsels führten schließlich die Enzymbestimmungen durch

WALLER et al. (1959), wobei insbesondere die Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, so etwa die Hexokinase oder die Triosephosphat-Isomerase, im Mittelpunkt des Interesses standen. Es zeigte sich, daß der Stoffwechsel der Plättchen im Vergleich zu anderen Zellelementen hoch ist; insbesondere fand sich im Thrombozyten - bezogen auf das Gesamtprotein - etwa 150mal mehr ATP als im Erythrozyten - ein Hinweis darauf, daß der Thrombozyt zu den energiereichsten Zellen überhaupt gehört. Die Befunde dieser Arbeitsgruppe (GROSS et al., 1958; WALLER et al., 1959) lassen noch auf ein Überwiegen der Glykolyse im Energiestoffwechsel der Plättchen schließen.

In den letzten Jahren hat nun ganz besonders die Beobachtung einer Proteinsynthese in den Plättchen selbst (MARSHAW et al., 1967; BOOYSE und RAFELSON, 1967 (a); ZIEVE und SOLOMON, 1968; COOPER und FIRKIN, 1970) die Thrombozytenforschung belebt. Bereits 1965 war diese Proteinsynthese von SEITZ diskutiert worden, und zwar aufgrund des hohen RNA-Gehaltes der Plättchen und besonders des intensiven Phosphatumsatzes dieser RNA. Bedeutsam ist dabei vor allem, daß die Syntheserate bis zu einem Drittel das kontraktile Protein der Blutplättchen betrifft (BOOYSE und RAFELSON, 1968). Dieses von BETTEX-GALLAND und LÜSCHER 1959 erstmals nachgewiesene und isolierte Thrombosthenin - ein dem Actomyosin des Muskels

verwandtes Molekül (Übersicht: LÜSCHER und BETTEX-GALLAND, 1971) - ist offenbar von großer Bedeutung für die Plättchenfunktion: Aggregation, Retraktion usw. (BOOYSE und RAFELSON, 1968). Schon 1956 hat LÜSCHER eine derartige Substanz mit ihrer Beziehung zur Plättchenfunktion diskutiert. Ausgehend von der Fähigkeit sowohl der Muskelzelle als auch des Thrombozyten zu mechanischer Arbeit, wiesen Untersuchungen zum Enzymverteilungsmuster und Berechnungen der Anteile einzelner Enzymproteine am Gesamtprotein der beiden Zellelemente (WALLER et al., 1959) auf eine - im übrigen später auch zytologisch bestätigte (WHITE, 1967, 1971) - Ähnlichkeit des Stoffwechsels von Skeletmuskulatur und Thrombozyten hin. Hier zeigt sich eine Verbindung zum Energiestoffwechsel, auf die BORN - er hatte eine Reduzierung des ATP-Gehaltes der Plättchen im Verlaufe der Gerinnungsvorgänge beobachtet - schon 1955 hingewiesen hat: ein intakter Energiestoffwechsel ist für die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten ebenso unerläßlich wie das Vorhandensein des kontraktilen Proteins (SCHNEIDER, 1970; Übersicht: GROSS und SCHNEIDER, 1971). Die Proteinsynthese der menschlichen Blutplättchen könnte demnach Parameter sein für ihr unterschiedliches Funktionsverhalten im Verlaufe der Alterung (BOOYSE et al., 1968; STEINER und BALDINI, 1969) und somit letztlich für den Hämostasemechanismus.

Die Kernlosigkeit der Plättchen führt zwangsläufig zu der Frage nach der Steuerung dieser Proteinsynthese. Die Fähigkeit zur eigenständigen Proteinsynthese wird bisher allgemein auf das Vorhandensein einer stabilen, noch aus dem Megakaryozyten stammenden Matrizen-RNA zurückgeführt (BOOYSE und RAFELSON, 1967 a, b), deren Lebensdauer als begrenzender Faktor für die Lebensdauer der Plättchen in vivo angesehen wird. Diese Annahme findet ihre scheinbare Bestätigung in der Tatsache, daß in menschlichen Blutplättchen bisher DNA nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte - oder allenfalls in Spuren, die aber dann meist auf Leukozytenkontamination zurückgeführt werden (TEDESCHI et al., 1966; Übersicht: SEITZ, 1965). Die Proteinsynthese wird ferner durch Puromycin, nicht aber durch Actinomycin gehemmt (BOOYSE und RAFELSON, 1967 a, b), und schließlich konnte ein Einbau markierter RNA-Vorstufen in Versuchen mit gewaschenen und in künstlichen Medien resuspendierten Thrombozyten nicht nachgewiesen werden (BOOYSE und RAFELSON, 1967 (b), 1968). Nicht selten finden sich Hinweise auf die Ähnlichkeit der Stoffwechselsituation von Thrombozyten und Retikulozyten (STEINER, 1970), wobei allerdings einem wichtigen Phänomen meist zu wenig Beachtung geschenkt wird: die kernlosen Retikulozyten besitzen wie die ebenfalls kernlosen Plättchen RNA und Mitochondrien, verlieren letztere aber im Verlaufe ihrer Reifung zum proteinsynthetisch

nicht mehr aktiven Erythrozyten. Die Untersuchungen von SCHNEIDER (1970) haben gezeigt, daß gerade den zuvor in den Blutplättchen wenig beachteten Mitochondrien große Bedeutung im Hinblick auf den Energiestoffwechsel zukommt. Es ist kein weiter Schritt zu der Frage, ob die Mitochondrien, deren Hauptfunktion neben der Energiebereitstellung doch darin besteht, die eigene genetische Kontinuität zu gewährleisten (WAGNER, 1969), nicht auch bei der Steuerung der Proteinsynthese in den Plättchen von Bedeutung sein könnten. In allen bisher untersuchten mitochondrienhaltigen Zellen hat sich mitochondriale DNA nachweisen lassen (NASS et al., 1965; CORNEO et al., 1968), und namhafte Genetiker haben schon sehr früh auf die Möglichkeit hingewiesen, daß auch andere Zellsysteme außer dem Kern für Vererbung und Steuerung von Zellfunktionen verantwortlich sein könnten (Übersicht: GRANICK und GIBOR, 1967). Durch Untersuchungen an Mutanten von Hefen und Neurospora mit zytoplasmatischem Vererbungsmechanismus, in deren mitochondrialem Strukturprotein man Abweichungen von der regelhaften Aminosäurenzahl und -sequenz nachweisen konnte (WOODWARD und MUNKRES, 1966), sind diese Ansichten bekräftigt worden. Die Fragestellung der hier beschriebenen Untersuchungen baut auf den zitierten Gedankengängen auf: der Thrombozyt würde die einzige bekannte Ausnahme bilden, wenn seine Mitochondrien keine DNA enthielten und somit keine

eigenständige genetische Aktivität besäßen. Könnte nicht vielmehr die fortlaufende Proteinsynthese, nämlich ganz besonders die Synthese des für die Plättchenfunktion so bedeutsamen Thrombosthenins, Ausdruck einer autonomen genetischen Aktivität der Plättchenmitochondrien sein? Vermutungen dieser Art sind bereits 1971 von GROSS und SCHNEIDER formuliert worden, und angeregt durch die dort niedergelegten Gedanken sowie durch unveröffentlichte Vorversuche von SCHNEIDER, zielten die vorliegenden Untersuchungen darauf hin, einen Beitrag zur Klärung dieser Frage zu leisten.

II. Methoden

A. Blutentnahme und Gewinnung von plättchenreichem Plasma, Thrombozytenzählung

Alle Untersuchungen wurden mit Thrombozyten aus frischem Venenblut gesunder Spender durchgeführt, das mit Hilfe des Blutentnahmebestecks Donafix (BRAUN, Melsungen) unmittelbar in Kunststoffgefäße abgelassen und mit einer darin im Verhältnis 1:9 als Antikoagulans vorgelegten 3,8-proz. Natriumcitratlösung vorsichtig vermischt wurde.
Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde gewonnen durch 10 min Zentrifugation des Zitratblutes in 10-ml-Kunststoffröhrchen bei ca. 120 g (Zentrifuge: Modell 03400 von HERAEUS CHRIST GmbH, Osterode/Harz) und vorsichtiges Abheben der Plasmazone mit Kunststoffpipetten, plättchenarmes Plasma (PAP) durch Zentrifugation bei ca. 3300 g.
Zur Ermittlung und Einstellung der Thrombozytenzahlen wurde die Methode der direkten Zählung in der Zählkammer nach FEISSLY und LÜDIN (1949) angewandt. Leukozytenkontamination wurde durch Auszählen der Leukozyten und gegebenenfalls Nachzentrifugation unwahrscheinlich gemacht.

B. Dünnschichtchromatographische Methoden

1. Nachweis der Thymidin-Phosphorylierung

a) in intakten Plättchen

PRP mit 1 µCi/ml Thymidin-Methyl-^{3}H (ca. 60 nMol/l) wurde im Schüttelwasserbad (Modell 3047 von KÖTTERMANN, Hänigsen) 2 h bei einer Temperatur von 37° C in flacher Schicht (3-4 mm) inkubiert; danach wurden die Plättchen abzentrifugiert (3000 g) und 3x in physiologischer Kochsalzlösung mit 1% EDTA gewaschen. Zytolyse in 6-proz. Perchlorsäure. Nach Neutralisation des Überstandes mit 2 m K_2CO_3-Lösung wurden 0,2 ml mit dem AUTOLINER nach STAHL (DESAGA GmbH, Heidelberg) bandförmig auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen, ebenso - in gesonderter Bahn - eine Probe mit gleicher Aufarbeitung

ohne vorhergehende Inkubation sowie als Kontrolle ein Gemisch von unmarkiertem Thymidin und seinen Phosphaten. Die Platten wurden in der nicht gesättigten Kammer mit folgendem Fließmittel entwickelt (Laufstrecke 15 cm): n-Butanol/Aceton/Eisessig/15-proz. Ammoniak/Wasser im Verhältnis 3,5/2,5/1,5/1,5/1,0 (RANDERATH, 1961) und mit dem Dünnschicht-Scanner II von BERTHOLD/FRIESEKE GmbH, Karlsruhe-Durlach, ausgewertet. Zur optischen Auswertung der Platten im UV-Licht wurde die Analyselampe UVIS von DESAGA, Heidelberg, benutzt.

b) in Plättchenhomogenat

Zytolyse zu Beginn der Aufarbeitung. Nach Zusatz von ATP und $MgCl_2$ (beide 10^{-3} Mol/l) wurde der Ansatz 2 h bei 37° C inkubiert. Ansatzaktivität und weitere Aufarbeitung wie unter a).

2. Nachweis der Uridin-Phosphorylierung

a) in intakten Plättchen b) in Plättchenhomogenat

Ansatz und Arbeitsgang wie unter 1 a und b; es wurde lediglich statt Thymidin-Methyl-^{3}H Uridin-5-^{3}H eingesetzt (1 µCi/ml, entspr. ca. 50 nMol/l). Als Kontrolle diente ein Gemisch von unmarkiertem Uridin und seinen Phosphaten.

3. Orotsäureinkorporation

PRP mit 1 µCi/ml Orotsäure-5-^{3}H (1-4 µMol/l) wurde im Schüttelwasserbad bei 37° C in flachen Schichten (3-4 mm) 6 h inkubiert. Dann wurden die Plättchen abzentrifugiert (ca. 3000 g) und 3x in eiskalter phys. NaCl-Lösung mit 1% EDTA gewaschen. Das verbleibende Sediment wurde in 2 ml eiskalte Perchlorsäure (0,6 n) aufgenommen und unter Eiskühlung durch Ultraschall (2 min) homogenisiert (BRAUN SONIC-300 Homogenisator, BRAUN Apparatebau, Melsungen - 9,5-mm-Sonde, Einstellung 50). Nach scharfer Zentrifugation (3300 g) und Neutralisation des Überstandes mit 2 m K_2CO_3 wurden 0,2 ml bandförmig auf DC-Platten aufgetragen. Weitere Aufarbeitung wie unter 1 a).

C. Aktivitätsmessungen im Flüssigkeitsszintillationszähler

1. Uridin- bzw. Thymidineinbau

a) in Abhängigkeit von der Plättchenzahl

Es wurden 6 Ansätze mit steigenden Plättchenzahlen durch Mischen von PRP und PAP im jeweiligen Verhältnis erstellt. Das Volumen der Ansätze, die je 0,2 ml einer phys. NaCl-Lösung mit 10 µCi/ml Uridin-2-^{14}C enthielten (Ansatzaktivität 1 µCi/ml, entspr. ca. 20 µMol/l), betrug jeweils 2 ml. Die Ansätze wurden 2 h bei 37° C im Schüttelwasserbad (mittlere Schüttelstärke, Einstellung 6-7 des Modells 3047 von KÖTTERMANN) in 10-ml-Röhrchen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit 10 min Zentrifugation bei ca. 2500 g. Die Sedimente wurden 3x in je 5 ml eiskalter Perchlorsäure (0,6 n) gewaschen und 1x mit je 5 ml Chloroform-Methanol (1:2) extrahiert. Danach wurden die Proben wieder 10 min bei 2500 g zentrifugiert und die Sedimente in je 2 ml warme (70° C) Perchlorsäure aufgenommen. 20 min Wasserbad bei 70°, anschließend erneute Zentrifugation (15 min bei ca. 3300 g). Vom Überstand wurde nun jeweils 1 ml in 10 ml Aquasol (im Meßgläschen) überführt und im Flüssigkeitsszintillationszähler (FSZ) gemessen (Modell SL 30 von INTERTECHNIQUE, 78 Plaisir, France).
(Testreihen hatten bei Verwendung des Szintillationsgemisches Toluol + PPO + POPOP (unter Zusatz von SOLUENE ^{R}) eine Verbesserung der Zählausbeute um im Mittel 27% ergeben; aus Gründen der Vereinheitlichung und einfacheren Handhabung wurde dennoch Aquasol als Szintillationsflüssigkeit beibehalten.)
Der gleiche Vorgang wurde mit Ansätzen wiederholt, die statt Uridin-2-^{14}C Thymidin-2-^{14}C enthielten (0,2 ml einer phys. NaCl-Lösung mit 10 µCi/ml, Ansatzaktivität also ebenfalls 1 µCi/ml, entspr. ca. 20 µMol/l).

b) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Mit PRP und PAP wurde der Plättchengehalt des verwendeten Plasmas so eingestellt, daß die Thrombozytenzahl im Ansatz 200000/µl betrug. Jeder Ansatz (Gesamtvolumen 2 ml) enthielt 1 µCi/ml Uridin-2-^{14}C, entspr. ca. 20 µMol/l (0,2 ml einer phys. NaCl-Lösung mit 10 µCi/ml). Wahlweise wurde auch Uridin-5-^{3}H in einer Ansatzaktivität von 5 µCi/ml, entspr. ca. 250 nMol/l, eingesetzt (0,2 ml einer phys. NaCl-Lösung mit 50 µCi/ml). Die An-

sätze wurden nach dem unter a) beschriebenen Verfahren aufgearbeitet, und zwar je zwei sofort (bei allen hier dargestellten Versuchen wurden zur Kontrolle Doppelansätze erstellt), nach 30, 60, 90, 120 und 150 (nur bei Uridin-5-^{3}H) min Inkubation bei 37° C.

Der gleiche Vorgang wurde wiederholt mit Thymidin-2-^{14}C in einer jeweiligen Ansatzaktivität von 1 µCi/ml (20 µMol/l).

2. Einzelbestimmungen der Uridineinbaurate bei gesunden Spendern (mit konstanter Plättchenzahl und Inkubationszeit)

Bei 16 gesunden Spendern wurden in 39 Einzelbestimmungen die Uridineinbauraten bei konstanter Plättchenzahl (200000/µl) und Inkubationszeit (2 h) ermittelt. Die Ansatzaktivität betrug jeweils 5 µCi/ml, entspr. ca. 250 nMol/l (Uridin-5-^{3}H). Die Aufarbeitung der Ansätze entsprach im übrigen der unter 1 a) beschriebenen.

3. Uridineinbau in Gegenwart von Actinomycin D

Zur Auflösung des Actinomycins wurde phys. NaCl-Lösung verwendet, die Ausgangskonzentration betrug 4 mg/ml. Uridin-5-^{3}H in phys. NaCl-Lösung wurde hier in der Ausgangsaktivität von 100 µCi/ml benutzt. Die Ansätze enthielten bei einem Gesamtvolumen von 2 ml und einer Plättchenzahl von 200000/µl 0,1 ml der angegebenen Uridin-Lösung (Ansatzaktivität 5 µCi/ml, entspr. ca. 250 nMol/l). Von der Actinomycin-Stammlösung wurden eingesetzt: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 ml, das ergibt Ansatzkonzentrationen von 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,20 mg/ml ($3,2 \times 10^{-5}$ bis $1,6 \times 10^{-4}$ Mol/l). Zum Volumenausgleich diente wiederum phys. NaCl-Lösung. Die Ansätze wurden nach dem unter 1 a) beschriebenen Verfahren aufgearbeitet (Inkubationsdauer 2 h). Es wurden insgesamt 4 Versuche, jeweils mit Doppelansätzen, durchgeführt.

4. Gesamtinkorporation des markierten-Uridins in Abhängigkeit von der Zeit und der Actinomycin-Konzentration

2 Leeransätze, 5 Doppelansätze ohne Actinomycin mit steigender Inkubationszeit und 5 Doppelansätze mit stei-

gender Actinomycin-Konzentration (wie unter 3.) und gleichbleibender Inkubationszeit von 2 h (die Plättchenzahl betrug in allen Ansätzen 200000/µl) wurden nach der Inkubation 10 min bei ca. 3000 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden 3x in je 5 ml eiskalter phys. NaCl-Lösung gewaschen, dann in je 2 ml warme (70° C) Perchlorsäure (0,6 n) aufgenommen und 20 min bei 70° im Wasserbad belassen. Erneute Zentrifugation bei ca. 3300 g (15 min). Vom Überstand wurde jeweils 1 ml in 10 ml Aquasol überführt und im FSZ gemessen.

5. Uridin- bzw. Uracileinbau in Gegenwart von 2-Desoxy-D-glucose

Zwei Ansatzreihen wurden erstellt mit a) Uridin-5-^{3}H und b) Uracil-5-^{3}H mit Ansatzaktivitäten von jeweils 5 µCi pro ml, entspr. ca. 250 nMol/l (die Ansätze enthielten - außer dem Leeransatz - 0,2 ml einer Stammlösung von 50 µCi/ml bei einem Gesamtvolumen von 2 ml). Jede Ansatzreihe (Thrombozytenzahl 200000/µl) enthielt 2-Desoxy-D-glucose in steigenden Konzentrationen, und zwar 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,20 ml einer 0,3 m Stammlösung (Volumenausgleich mit phys. NaCl-Lösung), das sind Ansatzkonzentrationen von 6, 12, 18, 24 und 30 mMol/l. Die Aufarbeitung der Ansätze - nach 2 h Inkubation bei 37° - entspricht der unter 1 a) beschriebenen.

6. Orotsäureinkorporation

Ansätze von 10 ml PRP (flache Schichten von 3-4 mm Höhe in gleichen Erlenmeyerkölbchen) mit 1 µCi/ml (1-4 µMol pro l) Orotsäure-5-^{3}H. Je zwei Ansätze wurden sofort, nach 30, 60, 90 und 120 min Inkubation bei 37° C zentrifugiert (3000 g). Die Sedimente wurden 3x in je 5 ml eiskalter phys. NaCl-Lösung mit 1% EDTA gewaschen. Die verbleibenden Sedimente wurden in je 2 ml eiskalte 0,6 n Perchlorsäure aufgenommen und unter Eiskühlung durch Ultraschall (2 min) homogenisiert (vergl. B 3). Nach scharfer Zentrifugation (15 min bei 3300 g) wurden von jedem Überstand 0,5 ml in 10 ml Aquasol überführt und im FSZ gemessen.

7. Uridineinbau in Gegenwart von cAMP

Eine PRP-Ansatzreihe mit konstanter Plättchenzahl von 200000/µl und einer Uridin-5-^{3}H-Ansatzaktivität von 5 µCi/ml (entspr. ca. 250 nMol/l) wurde mit steigenden Konzentrationen von Dibutyryl-cAMP versetzt (0,2 bis 2000 µMol/l, Volumenausgleich jeweils mit phys. NaCl-Lösung). Aufarbeitung wie unter 1 a) (Inkubationszeit 2 h).

D. Gelchromatographische Methoden

1. Charakterisierung der neugebildeten höhermolekularen Fraktion

Mit PRP und PAP aus 500 ml Zitratblut sowie Uridin-5-^{3}H wurde eine Ansatzkonzentration von 200000 Plättchen pro µl und ca. 125 nMol/l (2,5 µCi/ml) Uridin eingestellt. Dieser Ausgangsansatz wurde 2 h im Schüttelwasserbad bei 37° C in flachen Schichten inkubiert, danach auf 10-ml-Röhrchen verteilt (ca. 7,5 ml pro Röhrchen) und 10 min bei 3000 g zentrifugiert. Die Sedimente wurden in phys. NaCl-Lösung gewaschen und nach Zytolyse mit 0,1 ml Aqua dest. in Acetat-EDTA-Puffer (pH 5,1) aufgenommen (4,4 ml). Hinzugefügt wurden 0,5 ml einer 5-proz. Stammlösung von Natriumdodecylsulfat (Endkonzentration 0,5%) und 1,5 ml einer wässrigen Phenol-Lösung (90-proz., 60° C). Nach 30 min Inkubation bei 60° C wurde 15 min bei 3300 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben, gesammelt und über Nacht im Dialysierschlauch gegen 2 Liter Zitratpuffer (0,015 Mol/l tri-Natriumcitrat-2-hydrat + 0,15 Mol/l NaCl, pH 7,0) dialysiert, dann im Rotationsverdampfer (Rotavapor-R von BÜCHI, Flawil, Schweiz) auf ca. 5 ml eingeengt. Die Hälfte des Konzentrats wurde an Sephadex G-75 superfine chromatographiert (Säule SR 25/100, 2,5 x 100 cm, von PHARMACIA Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Länge des Gelbettes hier 97 cm). Der Arbeitsdruck entsprach ca. 60 cm Wasser, als Elutionsmittel diente Zitratpuffer (s.o.). Als Fraktionensammler wurde der Ultro Rac 7000 von LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden, verwandt; zur Durchflußphotometrie (laufende Messung der Transmission) diente das Uvicord II, Nr. 8300 A von LKB, zur Registrierung der Fallbügelschreiber 6520 derselben Firma. Die Eichung der Säule wurde mit Hilfe der Molekulargewicht-Standards für die Gelchromatographie von SERVA (s. unter Materialien) durchgeführt.

Das Fraktionsvolumen betrug jeweils 5 ml. Davon wurde 1 ml in 10 ml Aquasol überführt und im FSZ gemessen. Der dabei ermittelte niedermolekulare Gipfel wurde gesammelt und nach Einengung im Rotationsverdampfer (auf ca. 4 ml) an Sephadex G-10 rechromatographiert. Dazu wurde eine Säule von 1,5 cm Durchmesser und 100 cm Länge benutzt (modifizierte K 15 von PHARMACIA), die Länge des Gelbettes betrug nahezu 100 cm, der Arbeitsdruck 100 cm H_2O; als Elutionsmittel diente der beschriebene Zitratpuffer.

2. Enzymatischer Abbau der neugebildeten Fraktion

Alle Fraktionen der unter 1. beschriebenen Chromatographie mit Ausnahme des niedermolekularen Gipfels wurden gesammelt, mit 10 mg Ribonuclease (RNase) A sowie 10000 Einheiten RNase T versetzt (pH eingestellt auf 7,8) und 22 h bei 37° C inkubiert. Danach Einengung im Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml und Rechromatographie an Sephadex G-75 superfine. Messung der relativen Fraktionsaktivität wie unter 1.

E. Materialien

Aquasol, NEF-934, Szintillationsflüssigkeit
Uridin-2-^{14}C, NEC-167, spez. Aktivität $>$ 50 mCi/mMol
Thymidin-2-^{14}C, NEC-156, spez. Aktivität $>$ 50 mCi/mMol
Uridin-5-^{3}H, NET-174, spez. Aktivität $>$ 20 Ci/mMol
Uracil-5-^{3}H, NET-333, spez. Aktivität $>$ 20 Ci/mMol
Orotsäure-5-^{3}H, NET-134, spez. Akt. 250-1000 mCi/mMol
Thymidin-Methyl-^{3}H, NET-027 X, spez. Akt. $>$ 15 Ci/mMol

- wurden von NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain b. Frankfurt/Main, bezogen,

N^6-2'-O-Dibutyryl-adenosin-3':5'-monophosphat, zyklisch, 15205, von BOEHRINGER Mannheim GmbH,

Ribonuclease A, 34388,
Ribonuclease T, 34394,
2-Desoxy-D-glucose, 18440,
Actinomycin D (krist., rein, 98% reines Actinomycin C_1), 10710,
Molekulargewicht-Standards für die Gelchromatographie, 39063, sowie alle
Kontrollsubstanzen für.die Dünnschichtchromatographie
von SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden ferner die DC-Fertigplatten HF 254, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Best.-Nr. 5715, von E. MERCK AG, Darmstadt, benutzt,

zur Gelchromatographie
Sephadex G-75 superfine und
Sephadex G-10 von
PHARMACIA Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

III. Ergebnisse

1. Einbau von markiertem Uridin bzw. Thymidin in eine höhermolekulare Fraktion

a) in Abhängigkeit von der Plättchenzahl

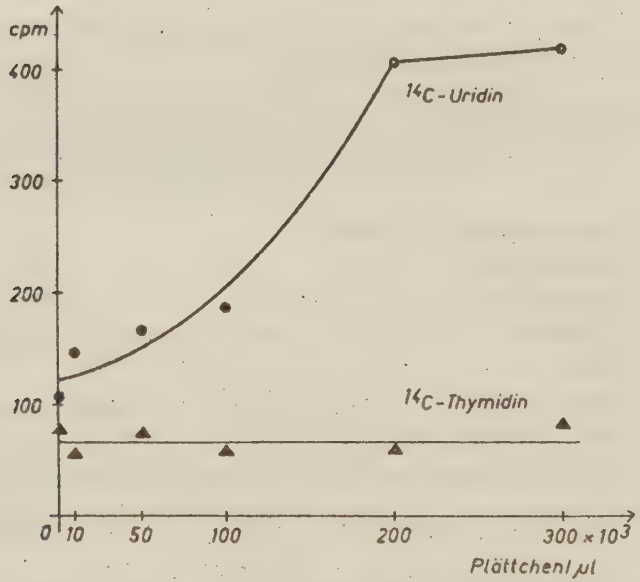

Abb. 1 Aktivitätsdiagramm einer nur mit warmer PCA extrahierbaren höhermolekularen Fraktion in Abhängigkeit vom Plättchengehalt des über 2 Stunden mit Uridin-2-^{14}C bzw. Thymidin-2-^{14}C bei 37° C inkubierten PRP (Mittelwerte aus 2 Versuchen, jeweils mit Doppelansätzen)

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, ist die im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessene Aktivität der Nucleinsäure-

fraktion nur im Falle des Uridins abhängig vom Plättchengehalt des zur Inkubation mit den markierten Nucleosiden verwendeten thrombozytenhaltigen Plasmas. Die Aktivität in den Proben aus dem mit Thymidin inkubierten PRP bleibt von der Veränderung des Plättchengehaltes unbeeinflußt. Die Werte aus diesen Proben liegen im Bereich der Leeraktivität.

b) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

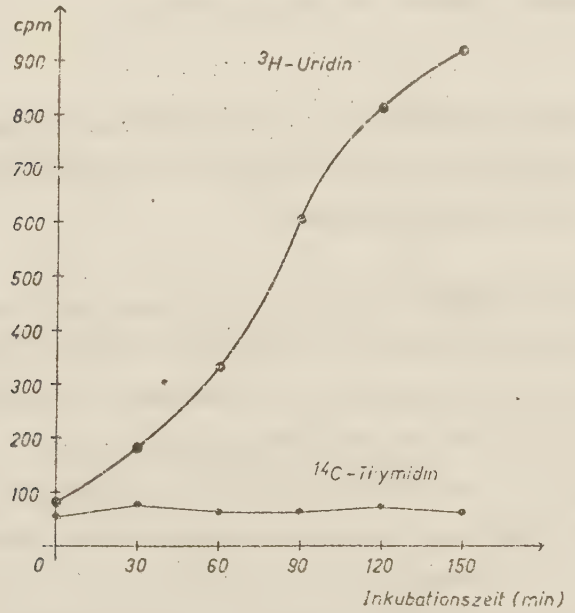

Abb. 2 Aktivitätsdiagramm einer nur mit warmer PCA extrahierbaren höhermolekularen Fraktion in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer des 200000 Plättchen pro µl enthaltenden PRP mit Uridin-5-^{3}H bzw. Thymidin-2-^{14}C

Abbildung 2 zeigt, daß ein Ansteigen der Aktivität in der höhermolekularen Fraktion mit zunehmender Inkubationsdauer des plättchenreichen Plasmas nur für das markierte Uridin zu registrieren ist. Es wurden auch 4 identische Versuche mit Uridin-2-^{14}C, allerdings nur über 120 min, durchgeführt, die das dargestellte Ergebnis bestätigen. Die Veränderung der Inkubationsdauer hat keinen Einfluß auf die Aktivität in den Thymidin-Proben, deren Werte in den Bereich der Leeraktivität einzuordnen sind. Das Diagramm beruht auf Mittelwerten aus 3 Versuchen, jeweils mit Doppelansätzen.

2. Einzelbestimmungen der Uridineinbaurate bei gesunden Spendern mit konstant eingestellter Plättchenzahl und Inkubationszeit

Bei 16 gesunden freiwilligen Blutspendern wurde in 39 Einzelbestimmungen die relative Uridineinbaurate ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen bewegten sich zwischen 408 und 3293 cpm (Mittelwert: 1048.4 $\pm$ 629.0). Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Bestimmungen bei den jeweiligen Versuchspersonen war sehr unterschiedlich, im ganzen jedoch zufriedenstellend. Abbildung 3 demonstriert die Ergebnisse in der logarithmischen Normalverteilung.

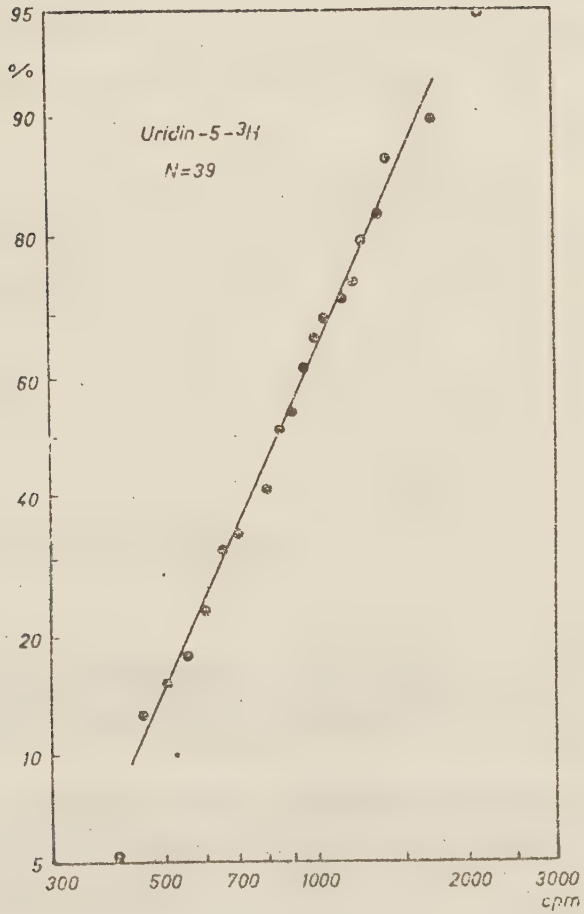

Abb. 3 Logarithmische Normalverteilung von 39 Einzelbestimmungen der relativen Uridineinbaurate bei 16 gesunden Blutspendern

3. Uridineinbau in Gegenwart von Actinomycin D

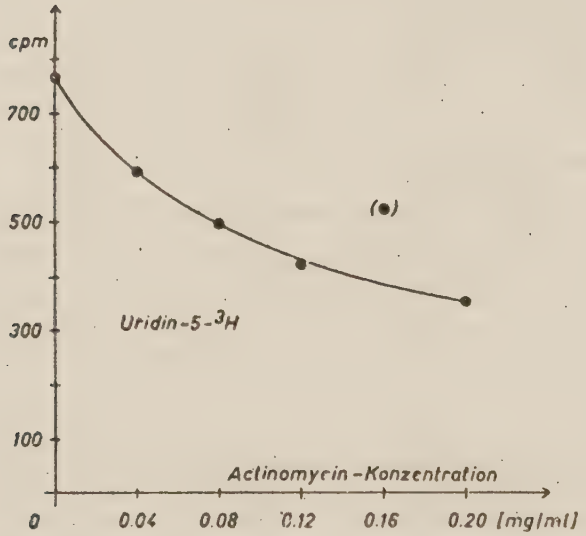

Abb. 4 Aktivität der Nucleinsäurefraktion nach 2 h Inkubation mit Uridin-5-^{3}H in Abhängigkeit von der Actinomycin-D-Konzentration im Ansatz (Plättchenzahl konstant 200000/µl)

Die in der Abbildung 4 auf der Abszisse angegebenen Actinomycin-Konzentrationen entsprechen folgenden Werten in Mol/l: $3{,}2 \times 10^{-5}$; $6{,}4 \times 10^{-5}$; $9{,}6 \times 10^{-5}$; $1{,}28 \times 10^{-4}$; $1{,}6 \times 10^{-4}$. Bei den dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus 4 Versuchen, jeweils mit Doppelansätzen. Bei der Actinomycin-Konzentration $1{,}28 \times 10^{-4}$ Mol/l weichen die Werte der jeweiligen Doppelan-

sätze in 3 Versuchen stark voneinander ab. Der entsprechende Mittelwert erscheint daher fragwürdig; die fallende Tendenz ist jedoch eindeutig: Actinomycin D hemmt den Uridineinbau in die Nucleinsäurefraktion.

4. Gesamtinkorporation des markierten Uridins in Abhängigkeit von der Zeit und der Actinomycin-D-Konzentration

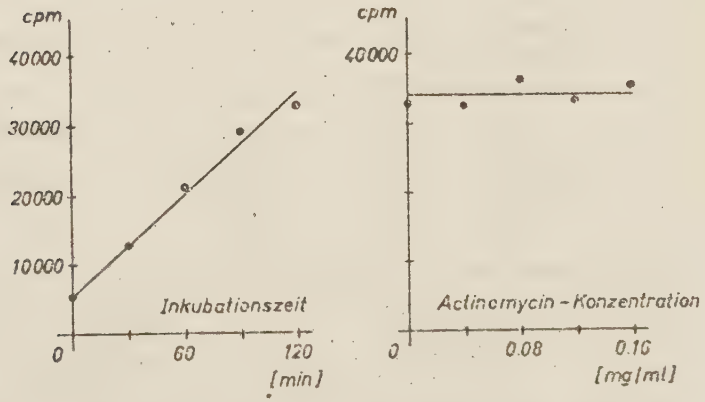

Abb. 5 Gesamtinkorporation des markierten Uridins ("precursor pool" + in die höhermolekulare Fraktion eingebaute Aktivität) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Actinomycin-D-Konzentration

Abbildung 5 zeigt, daß die Veränderung der Actinomycin-Konzentration keinen wesentlichen Einfluß auf die Membrandurchlässigkeit für das markierte Uridin ausübt. Da der Versuch die in die höhermolekulare Fraktion inte-

grierte Aktivität miterfaßt, hätte auch eine schwach fallende Tendenz gegen eine Membranwirkung des Actinomycins gesprochen. Eine in der Intensität des Abfalls der Dosiswirkungskurve des Actinomycins in Abbildung 4 entsprechende Reaktion hätte freilich auf eine unspezifische Membranwirkung schließen lassen.

5. Charakterisierung der neugebildeten Nucleinsäuren

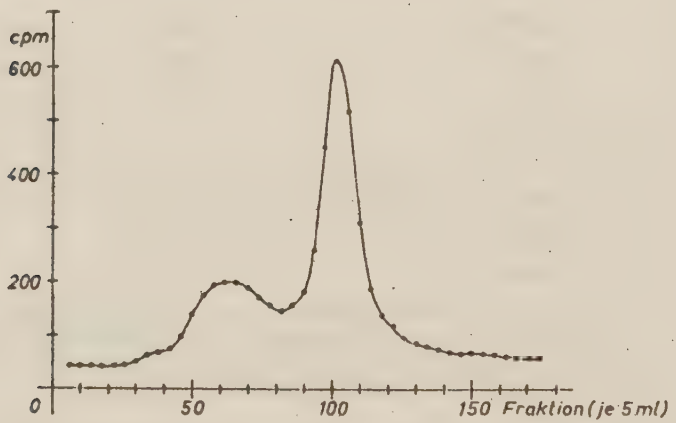

Abb. 6 Elutionsdiagramm eines Plättchenextraktes nach Inkubation mit Uridin-5-^{3}H bei Chromatographie an Sephadex G-75 superfine. Abszisse: laufende Nummer der Fraktion (je 5 ml), Ordinate: zugehörige Fraktionsaktivität, gemessen im FSZ

Abbildung 6 zeigt das Elutionsdiagramm eines Plättchenextraktes (nach Inkubation mit markiertem Uridin) an Sephadex G-75 superfine, die Ordinate gibt die relative

Aktivität der einzelnen Fraktionen an (nur 1/5 des Fraktionsvolumens wurde zur Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler eingesetzt). Der höhermolekulare Gipfel entspricht nach der Eichung der Säule mit den Molekulargewicht-Standards von SERVA einem Molekulargewicht von rund 20000; es findet sich allerdings auch ein deutlicher Aktivitätsanstieg (die Leeraktivität liegt bei etwa 45 cpm) bereits in den Fraktionen 34-38; das entspräche einem mittleren Molekulargewicht von rund 100000. Andere Versuche ergaben etwas geringere Molekulargewichte, der gesamte 20000-Gipfel mit dem 100000-Vorpeak war ein wenig in den niedermolekularen Bereich verschoben. Der niedermolekulare Gipfel, der in jedem Durchlauf konstant bei Fraktion 102/103 sein Maximum hatte, fällt in etwa zusammen mit dem in einer weiteren Eichchromatographie ermittelten Thymidin-Gipfel. Es dürfte sich dabei also um die Nucleotide handeln. Das zeigt auch die Rechromatographie des isolierten niedermolekularen Gipfels an Sephadex G-10: es ergeben sich mehrere Gipfel in dichten Abständen, deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt (s. Abb. 7).

Es muß betont werden, daß nur Inkubationszeiten von 2 Stunden zur Anwendung kamen. Das erklärt wohl die Breite und Verwaschenheit des höhermolekularen Gipfels in den meisten Versuchen; es wurden wahrscheinlich alle möglichen Synthesestadien erfaßt.

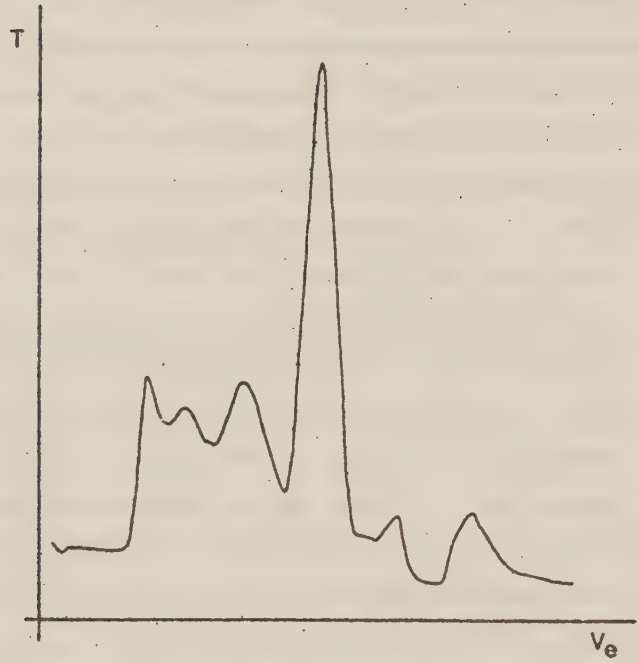

Abb. 7 Elutionsdiagramm des niedermolekularen Gipfels aus Abb. 6 an Sephadex G-10. Abszisse: Elutionsvolumen, Ordinate: Transmission

6. Enzymatischer Abbau der höhermolekularen Fraktion

Nach Inkubation der unter 5. beschriebenen höhermolekularen Fraktionen mit Ribonuclease A und T war der entsprechende Aktivitätsgipfel im Elutionsdiagramm bei Rechromatographie an Sephadex G-75 superfine nicht mehr nachweisbar (Abb. 8).

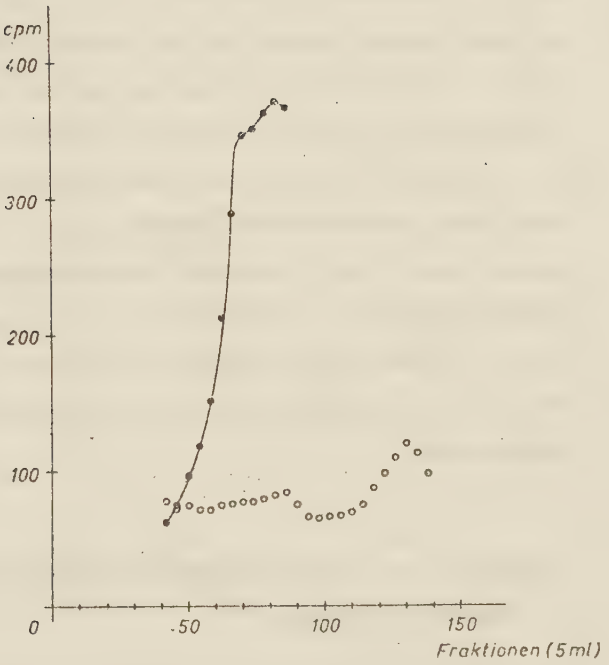

Abb. 8 Elutionsdiagramm allein des höhermolekularen Gipfels (aus einer G-75-Chromatographie von Plättchenextrakt nach Inkubation mit Uridin-5-^{3}H) bei Rechromatographie vor (•) und nach (◦) Behandlung mit Ribonuclease A und T

Das erwartete Erscheinen eines niedermolekularen Gipfels im zuvor ermittelten Nucleotidbereich war nicht eindeutig registrierbar. Bei einem Versuch erschienen mehrere kleine Gipfel vom Bereich des Ausgangspeaks bis zum Nucleotidbereich, bei dem hier dargestellten zeigte sich ein distinkter Peak, der noch um ca. 100 ml Elutionsvolumen jenseits des Nucleotidpeaks in Richtung sinkenden

Molekulargewichts verschoben war. Die Tendenz war jedoch in jedem Versuch eindeutig: es zeigte sich nach Inkubation der Thrombozyten mit radioaktiv markiertem Uridin und Extraktion der Nucleinsäure- und Nucleotidfraktion in der Chromatographie ein höhermolekularer Bereich mit deutlicher Aktivitätsanreicherung. Nach Inkubation mit Ribonuclease A und T war der höhermolekulare Gipfel bei Rechromatographie am gleichen Gel nicht mehr nachweisbar, es fanden sich stattdessen kleine niedermolekulare Peaks, die unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen entsprechen.

7. Uridin- bzw. Uracil-Einbau in Gegenwart von 2-Desoxy-D-glucose

Nach Inkubation von plättchenreichem Plasma mit
a) markiertem Uridin und
b) markiertem Uracil
sowie (in beiden Fällen) steigenden Konzentrationen von 2-Desoxy-D-glucose zeigt sich für Uridin keinerlei Zusammenhang zwischen Einbaurate und Desoxyglucose-Konzentration; im Falle des Uracils findet sich dagegen eine deutliche Hemmung des Einbaus in die Nucleinsäurefraktion. Diese Befunde veranschaulicht Abb. 9.

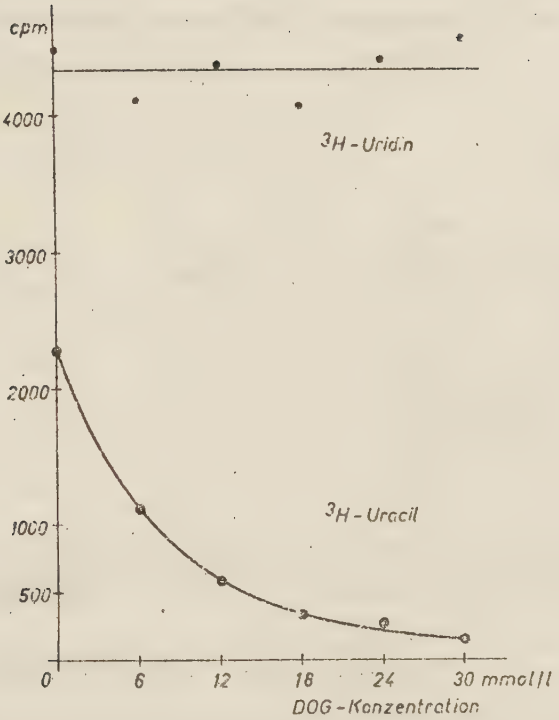

Abb. 9 Abhängigkeit des Uridin- bzw. Uracileinbaus in eine Nucleinsäurefraktion von der Konzentration an 2-Desoxy-D-glucose

8. Orotsäureinkorporation

Abbildung 10 verdeutlicht die Abhängigkeit der Orotsäureinkorporation in die Blutplättchen von der Dauer der Inkubationszeit. Im Vergleich zu den für markiertes

Uridin gemessenen Werten (s. unter 4.) wird Orotsäure in nur geringem Maße inkorporiert (wenn auch hier nur 0,5 ml des Extraktes zur Messung im FSZ eingesetzt wurden).

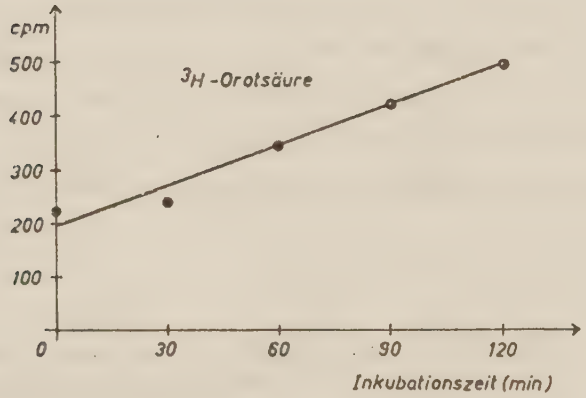

Abb. 10 Inkorporation von markierter Orotsäure in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Analyse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen zeigt, daß die inkorporierte 5-^{3}H-Orotsäure umgewandelt worden ist zu Uridin bzw. den Uridinphosphaten, in deren Bereich mit dem Dünnschicht-Scanner Radioaktivität nachgewiesen werden kann (Abb. 11).

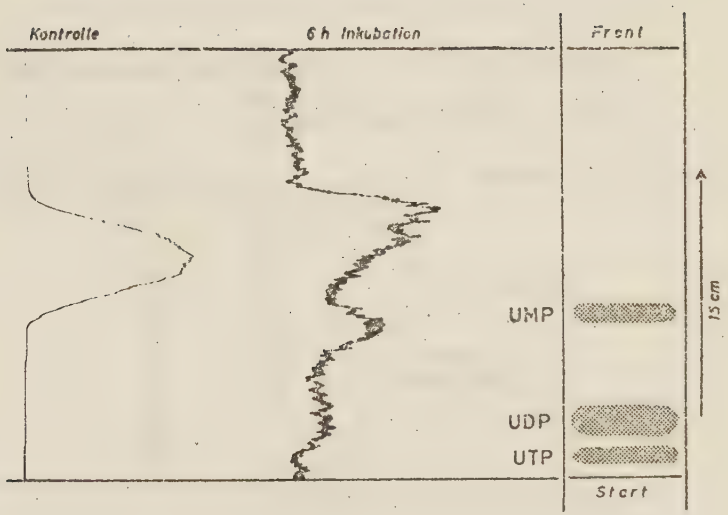

Abb. 11 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Umwandlung inkorporierter 5-^{3}H-Orotsäure zu Uridin bzw. den Uridinphosphaten

9. Versuch zum Nachweis der Thymidin-Phosphorylierung

Bei Versuchen mit intakten Plättchen wie auch mit Homogenat unter Zusatz von ATP und $MgCl_2$ läßt sich weder vor noch nach Inkubation mit radioaktiv markiertem Thymidin im Dünnschichtchromatogramm Aktivität im Bereich der Thymidinphosphate nachweisen (auf die Darstellung der Befunde mit intakten Plättchen soll deshalb verzichtet werden). Das Ergebnis des Homogenatversuches zeigt Abb. 12.

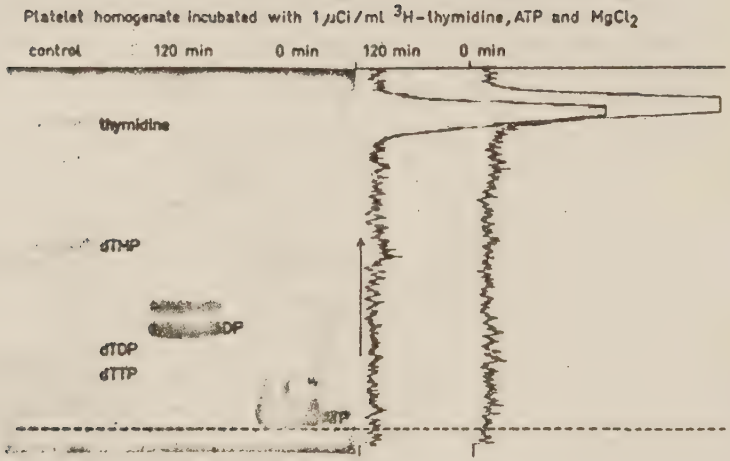

Abb. 12 Dünnschichtchromatogramm eines Versuches mit Plättchenhomogenat vor und nach Inkubation (2 h) mit Thymidin-Methyl-^{3}H; linke Seite: Photographie der Platte im UV-Licht (254 nm), rechte Seite: Auswertung mit dem Dünnschicht-Scanner

In der O-min-Bahn (ohne Inkubation) zeigt sich im UV-Licht eine ATP-Bande, im Chromatogramm der über 2 h inkubierten Probe findet man die ATP-Bande völlig umgesetzt, dafür ist hier eine ADP-Bande sichtbar.
Sowohl ohne als auch mit Inkubation ist jedoch nur nicht umgesetztes Thymidin nachweisbar.

10. Nachweis der Uridin-Phosphorylierung

a) in intakten Plättchen

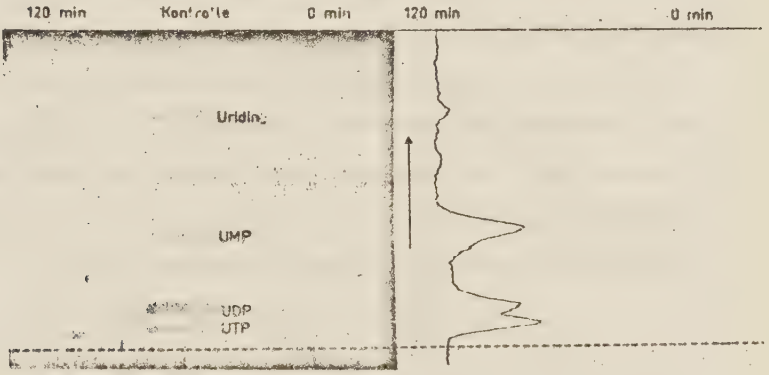

Abb. 13 Dünnschichtchromatogramm eines Plättchenextraktes nach 2 h Inkubation intakter Plättchen mit Uridin-5-^{3}H, links: Photographie der Platte im UV-Licht, rechts: Auswertung mit dem Dünnschicht-Scanner

Im Versuch mit intakten Plättchen findet sich nach 2 h Inkubation mit markiertem Uridin im Bereich aller drei Uridinphosphate eine Aktivitätsanreicherung (Abb. 13). In der Kontrollbahn ohne Inkubation ist keine Aktivität nachweisbar.

b) in Plättchenhomogenat

Auch im Versuch mit Plättchenhomogenat unter Zusatz von ATP und $MgCl_2$ läßt sich nach Inkubation mit Uridin-5-^{3}H

mit dem Dünnschicht-Scanner eine Aktivitätsanreicherung im Bereich r Nucleotide nachweisen. Während jedoch im Versuch an intakten Plättchen distinkte und ausgeprägt hohe Aktivitätsgipfel auch im Bereich von UDP und UTP zu finden sind, zeigt sich im Homogenatversuch lediglich ein distinkter Gipfel im UMP-Bereich; der zweite Gipfel ist eindeutig der ADP-Bande zuzuordnen, und eine Auftrennung des - im Vergleich zum Versuch mit intakten Plättchen viel niedrigeren - dritten Gipfels in UDP- und UTP-Bereich ist nicht sicher vollziehbar (Abb. 14).

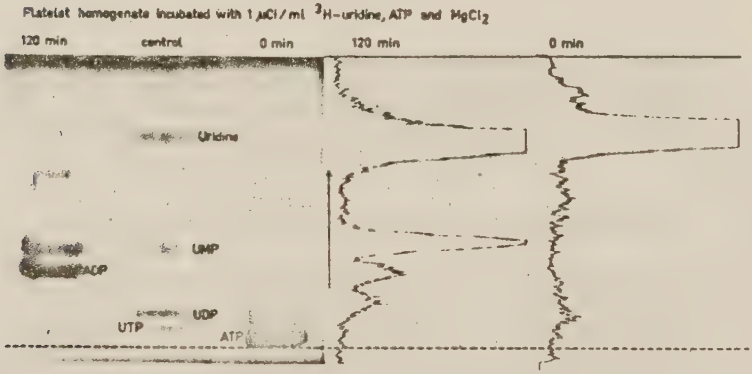

Abb. 14 Dünnschichtchromatogramm eines Versuches mit Plättchenhomogenat vor und nach 2 h Inkubation mit Uridin-5-^{3}H; links: Photographie der Platte im UV-Licht, rechts: Auswertung mit dem Dünnschicht-Scanner

11. Uridineinbau in Gegenwart von cAMP

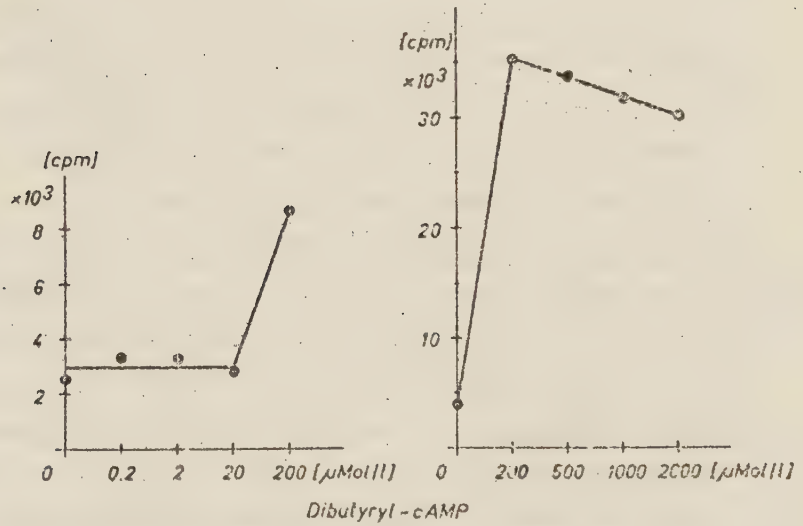

Abb. 15 Abhängigkeit des Uridineinbaus in die RNA-Fraktion von der cAMP-Konzentration (Dibutyryl-cAMP!) im Ansatz bei konstanter Plättchenzahl und Inkubationszeit

Aus Abbildung 15 geht hervor, daß der wirksame Konzentrationsbereich des (dibutyrylierten) zyklischen Adenosinmonophosphats zwischen 20 und 200 µMol/l liegen muß. Der Zusatz von 0,1 mg/ml = 0,2 mMol/l Dibutyryl-cAMP erhöht die Uridineinbaurate bis auf das 10-fache!

IV. Diskussion

In den beschriebenen Versuchen konnte ein Einbau von radioaktiv markiertem Uridin, nicht aber von Thymidin, in eine aus menschlichen Blutplättchen extrahierbare höhermolekulare Fraktion mit Absorptionsmaximum bei 260 nm nachgewiesen werden. Das bedeutet, daß eine RNA-Neusynthese in den Plättchen ablaufen muß. Diese Befunde stehen damit im Gegensatz zu den Angaben von BOOYSE und RAFELSON (1967 b, 1968). Die chromatographische Darstellung der höhermolekularen Fraktion, in die das markierte Uridin eingebaut wurde, weist auf ein (durch Vergleich mit Eichsubstanzen bestimmtes) Molekulargewicht zwischen 10000 und 100000 hin. Die Möglichkeit des Abbaus der neusynthetisierten Nucleinsäurefraktion durch Ribonucleasen kennzeichnet sie als RNA. Es stellt sich die Frage, ob das negative Ergebnis der Thymidin-Versuche die Hinweise auf das mittlerweile als sicher angesehene Fehlen von DNA in den Plättchen weiter bestätigt. Ein Fehlen von DNA scheint in mehrfacher Hinsicht unglaubwürdig:

1) In allen bisher untersuchten mitochondrienhaltigen Zellen hat sich mitochondriale DNA nachweisen lassen (NASS et al., 1965; CORNEO et al., 1968); der Thrombozyt würde somit die einzige bekannte Ausnahme bilden.

2) Der Einbau des markierten Uridins in die RNA-Fraktion ist hemmbar durch Actinomycin D in Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-4} Mol/l. Nun ist hinlänglich bekannt, daß Actinomycin die Transkription der DNA in die basenkomplementäre Matrizen-RNA hemmt; eine Hemmung des Uridin-Einbaus durch Actinomycin D ohne Vorhandensein von DNA wäre damit nur durch eine unspezifische Membranwirkung erklärbar. Eine solche Membranwirkung konnte durch die normale Uridin-Inkorporation in Gegenwart von Actinomycin D ausgeschlossen werden. Es handelt sich also um eine spezifische Hemmwirkung des Actinomycins, die auf das Vorhandensein von (mitochondrialer) DNA in den Blutplättchen hinweist.

3) Das Fehlen eines Thymidin-Einbaus könnte Folge eines Mangels an Thymidinkinase sein. Das würde insofern nicht verwundern, als wir es beim Thrombozyten mit einer nicht proliferativen "Zelle" zu tun haben, nur in einer solchen aber die Thymidinkinase induziert wird. Die fehlende Phosphorylierung von Thymidin ist damit kein Beweis gegen das Vorhandensein von DNA.

In den hier beschriebenen Versuchen zur Charakterisierung der neusynthetisierten RNA war immer wieder ein durch Transmissionsmessung registrierter hochmolekularer, distinkter Gipfel aufgefallen, der dem (Eichchromatographien zufolge) entsprechenden Molekulargewicht nach an DNA hatte denken lassen, der aber andererseits nicht

nur RNase-A- und -T_1- sowie Pronase-P-resistent war, sondern auch durch Behandlung mit DNase nicht abgebaut werden konnte. Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß in diesem Falle - aufgrund der strukturellen Besonderheiten mitochondrialer DNA (CORNEO et al., 1968; Übersicht: GRANICK und GIBOR, 1967) - die DNase unwirksam blieb.

Die Tatsache, daß sowohl nach Ergebnissen aus unserem Laboratorium (SCHNEIDER et al., 1971) als auch nach den Angaben in der Literatur (BOOYSE und RAFELSON, 1967 a, b) die Proteinsynthese durch Actinomycin nicht hemmbar ist, widerspricht der Ansicht vom Vorhandensein mitochondrialer DNA nicht. Da nur Inkubationszeiten bis maximal 2 Stunden angewandt wurden, liegt trotz der in Gegenwart von Actinomycin nachweisbaren Hemmung der RNA-Synthese innerhalb dieser relativ kurzen Zeit offenbar noch ausreichend RNA vor, um die Proteinsynthese (zunächst) sicherzustellen. Das läßt - nicht zuletzt in Anbetracht der außerordentlich großen Stabilität mitochondrialer DNA (CORNEO et al., 1968) - die Annahme einer autonomen, DNA-abhängigen mitochondrialen Proteinsynthese, wie sie bisher in allen untersuchten mitochondrienhaltigen Zellen nachgewiesen werden konnte (Übersicht: WAGNER, 1969), gerechtfertigt erscheinen. Zu einem solchen Schluß veranlaßt weiterhin besonders die Angabe, daß die in den Blutplättchen nachweisbare

RNA in den Mitochondrien lokalisiert ist (LÜSCHER, 1959 b). In guter Übereinstimmung damit steht die in einigen Diagrammen der Versuche zum Uridineinbau feststellbare Abnahme der Einbaurate nach 2 h Inkubation, also rund 4 Stunden nach der Blutentnahme, was unschwer mit der Überlebenszeit der Mitochondrien unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu korrelieren ist.
Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß bisher DNA in den Blutplättchen nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungen:

1) Thrombozyten enthalten nur etwa 2-3 Mitochondrien (die Leberzelle vergleichsweise bis zu 2500), und diese Mitochondrien sind sehr klein (die größten Mitochondrien einer Leberzelle sind fast ebenso groß wie ein ganzes Blutplättchen).

2) Der DNA-Gehalt pro Mitochondrion liegt im Bereich von 1 bis 5 x 10^{-10} µg. Die Nucleinsäuren insgesamt machen weniger als 5% der Trockensubstanz eines Mitochondrions aus; der Anteil der DNA hiervon beträgt nur etwa 15% (BIELKA, 1969).

3) Die strukturelle Andersartigkeit der mitochondrialen DNA ist die Ursache dafür, daß bei den meisten Mitochondrien die zytochemischen DNA-Nachweismethoden negative Ergebnisse erbringen (GRANICK und GIBOR, 1967). Die bisherigen DNA-Nachweisversuche an Throm-

bozyten aber waren zytochemischer Art (TEDESCHI et al., 1966; Übersicht: SEITZ, 1965). Die zweisträngige mitochondriale DNA, die insbesondere nicht mit Protein assoziiert ist (ähnlich der Bakterien-DNA), kann ringförmig sein und weist eine Länge von etwa 5 µ auf (entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 10^7). Mehrere solcher Ringe können wie Kettenglieder miteinander verknüpft vorkommen. Dies führt auch zur Abgrenzung von der nucleären DNA im Dichtegradienten und bei der Bestimmung des sog. "Schmelzpunktes" (Übersicht: GRANICK und GIBOR, 1967; CORNEO et al., 1968; HARBERS, 1969).

Überschlagsberechnungen ergaben, daß Mitochondrien nur einen Teil ihres Strukturproteins zu codieren vermögen. Ein DNA-Strang von 5 µ Länge dürfte nämlich unter Zugrundelegung des Triplet-Codes nicht mehr als 50 Polypeptidketten vom Molekulargewicht 15000 bis 20000 codieren (WAGNER, 1969). Der Informationsgehalt der DNA in den Mitochondrien reicht somit nicht zu vollständiger genetischer Autonomie aus, sondern erlaubt offenbar nur die Bildung bestimmter Grundstrukturen (GRANICK und GIBOR, 1967; WAGNER, 1969). Die Proteine der äußeren Membran werden dagegen außerhalb der Organellen gebildet und erst später angelagert (nach HARBERS, 1969). Neueren Untersuchungen zufolge (SCHWEYEN und KAUDEWITZ, 1970) sind die Grenzen allerdings nicht derart scharf und

Übergänge möglich. Die Mitochondrien verfügen über eigene Ribosomen. STEINER (1970) hat in jüngster Zeit zwei Klassen von Polyribosomen aus menschlichen Blutplättchen isoliert. Diese Polysomen synthetisierten Myosin- und Actin-ähnliche Proteine auch im zellfreien System. Aus der Abhängigkeit der Mitochondrien von den Genen des Zellkerns erklärt es sich, weshalb es nicht gelang, isolierte Mitochondrien in einer Kultur zu züchten (nach HARBERS, 1969). Die durch das Fehlen des Zellkerns ebenfalls fortgefallene Steuerung und Repression der Proteinsynthese könnte damit aber andererseits den ungewöhnlich hohen Gehalt der Blutplättchen an kontraktilem Protein (15-20%, BOOYSE und RAFELSON, 1967 b) bedingen. Kontraktile Strukturproteine konnten auch aus Mitochondrien anderer Zellen isoliert werden (Übersicht: GROSS und SCHNEIDER, 1971), allerdings in weitaus geringeren Mengen. Man muß die Möglichkeit diskutieren, daß dieser hohe Gehalt an kontraktilem Protein in den Blutplättchen die Folge des vergeblichen Versuchs einer Neubildung von Mitochondrien ist, einer Neubildung, die infolge des fehlenden Kerns und damit des Ausfalls der durch den Kern codierten Proteine unvollkommen bleiben muß und lediglich immer wieder einen Teil des Strukturproteins zu liefern vermag, zu dem auch das kontraktile Protein gehört. Derartige Zusammenhänge sind bereits 1971 von GROSS und SCHNEIDER diskutiert worden. Es sei an dieser

Stelle auf die interessanten Experimente an sog. Promitochondrien von Hefezellen verwiesen (SCHATZ und SALTZGABER, 1969; ROUSLIN und SCHATZ, 1969): unter anaeroben Bedingungen bilden sich in den Hefezellen keine kompletten Mitochondrien, sondern lediglich Strukturproteine, die nach Begasung mit O_2 zu ganzen Mitochondrien vervollständigt werden.

Als weitere Bestätigung einer möglicherweise mitochondrialen, DNA-abhängigen Proteinsynthese der Blutplättchen darf auch das Ergebnis der 39 Einzeluntersuchungen zum Uridin-Einbau bei gesunden Normalpersonen gewertet werden. Die Regelmäßigkeit der logarithmischen Normalverteilung läßt die zufällige Verteilung unbestimmter Mengen von Matrizen-RNA aus dem Megakaryozyten an die Blutplättchen, wie sie nach der Vorstellung von BOOYSE und RAFELSON (1967 b) angenommen werden muß, wenig wahrscheinlich anmuten.

Nun ist die Nucleinsäuresynthese aus präformierten Nucleosiden wie dem Uridin nicht der einzige Aufbauweg. Die Biosynthese des Pyrimidinrings nimmt ihren Ausgang von Asparaginsäure und Carbamylphosphat, die sich zur Carbamylasparaginsäure umsetzen. Durch Ringschluß entsteht unter ATP-Verbrauch Dihydroorotsäure, die noch dehydriert wird zu Orotsäure, einer wichtigen Zwischenstufe der Pyrimidinnucleotide. Außerdem kann freies Uracil mit Ribose-1-phosphat in das Nucleosid und weiter

mit ATP in das Nucleotid verwandelt werden (nach KARLSON, 1970). Es wurde deshalb zunächst auch die Inkorporation von Orotsäure-5-^{3}H untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Orotsäure zwar in weitaus geringerem Maße inkorporiert wird als Uridin (erklärbar insofern, als normalerweise die Orotsäure in der Zelle selbst gebildet wird und nicht die Membran passieren muß), aber doch ebenfalls in Nucleotide umgewandelt wird.

SHMERLING (1969) hat auf die spezifische Hemmbarkeit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von Mitochondrien durch Rifamycin hingewiesen. Es sind deshalb mehrere Versuche unternommen worden, die die Abhängigkeit des Uridineinbaus von der Rifamycin-Konzentration klären sollten. Leider stand keine Reinsubstanz, sondern nur eine pharmazeutische Präparation zur Verfügung, so daß die negativen Ergebnisse nicht unbedingt im Widerspruch zum bisher Ausgeführten stehen.

Der Rückgang im Kurvenanstieg bei einer Plättchenzahl von 200000/µl in den Kurven zur Abhängigkeit des Uridineinbaus von der Plättchenzahl mag auf eine Art Konkurrenzeffekt zurückzuführen sein; die Plättchenkonzentration von 200000/µl hat sich in allen Fällen als Optimum erwiesen. Auch in einem der Versuche zur Charakterisierung der neusynthetisierten RNA, bei dem die Plättchenzahl des verarbeiteten PRP ausnahmsweise weit mehr als 200000/µl betrug, kam es zu einer erheblich geringeren

Aktivitätsanreicherung in der höhermolekularen Fraktion als in den übrigen Versuchen.

Hinweise auf Nucleinsäurestimulation durch zyklisches 3':5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) (PERLMAN und PASTAN, 1968 a, b; CROMBRUGGHE et al., 1969; WHITFIELD et al., 1970) und auf eine Beziehung dieser Substanz zur ADP- und Adrenalin-induzierten Plättchenaggregation - sie wird durch cAMP und sein Dibutyryl-Derivat gehemmt - (MARQUIS et al., 1969; VIGDAHL et al., 1969; SALZMAN und NERI, 1969; MARQUIS et al., 1970) gaben den Anlaß, die Auswirkung dieser Verbindung in ihrer dibutyrylierten Form auf den Uridineinbau zu untersuchen. Die ausgeprägte Steigerung der Uridineinbaurate bis auf das 10-fache durch eine Dibutyryl-cAMP-Konzentration von 200 µMol/l ist ein weiterer Hinweis auf die komplexe Funktion dieser bedeutsamen Substanz im Plättchenstoffwechsel (WOLFE und SHULMAN, 1969; ZIEVE und GREENOUGH, 1969). In Übereinstimmung mit den beschriebenen Dibutyryl-cAMP-Befunden stehen noch unveröffentlichte Ergebnisse von SCHNEIDER, die eine Steigerung des Uridineinbaus durch Glukagon erkennen lassen. Es wird interessant sein, die Auswirkung der Prostaglandine in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Ein Einfluß von Prostaglandin E_1 (PGE_1) auf den cAMP-Gehalt in menschlichen Blutplättchen ist beschrieben (ROBISON et al., 1969). MARQUIS et al. (1969) haben die Hemmung der Plättchenaggregation durch PGE_1

mit einer Steigerung der cAMP-Synthese in der Membranfraktion der Blutplättchen über eine direkte oder indirekte Stimulation der Adenylzyklase erklärt: der cAMP-Gehalt (der auch durch Coffein über eine Hemmung der Phosphodiesterase gesteigert werden kann) verändert sich in Gegenwart von PGE_1 parallel - nach neueren Befunden (BALL et al., 1970) geht die Steigerung des cAMP-Gehaltes um Minuten voraus - zur physiologischen Antwort (Hemmung der Plättchenaggregation).

Die Versuche zum Uridin- bzw. Uracileinbau in Gegenwart von 2-Desoxy-D-glucose gingen von dem Gedanken aus, daß Desoxyglucose als kompetitiver Hemmer der Hexokinase im Falle des Uracils eine Hemmung des Einbaus verursachen müßte: durch die stärkere Hemmung der C-1-Decarboxylierung - also des Pentosephosphat-Zyklus - dürfte nicht mehr genügend Ribose-1-phosphat zur Verfügung stehen, um das Uracil zum Uridin, die Base zum Nucleosid umzuwandeln. Wie aus Abb. 9 ersichtlich, hat sich diese Erwartung vollauf bestätigen lassen. Uracil, dessen Einbaurate etwa um die Hälfte geringer ist als die des Uridins, wird durch Desoxyglucose in seinem Einbau gehemmt, Uridin dagegen nicht. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Komplexität der Stoffwechselleistungen der Blutplättchen - eine Komplexität, die vielleicht die Ursache dafür ist, daß andere Autoren einen Einbau von RNA-Vorstufen in eine höhermolekulare Fraktion nicht nachweisen

konnten (wobei betont werden muß, daß SEITZ schon 1965, nachdem er Thrombozyten in einem Medium inkubiert hatte, das gleichmäßig markierte ^{14}C-Glucose enthielt, nicht nur im Protein der Plättchen, sondern auch in der RNA-Fraktion eine nahezu identische Aktivitätsanreicherung fand). Sie benutzten nämlich nicht PRP als Inkubationsmedium, sondern arbeiteten mit gewaschenen und in künstlichen Medien resuspendierten Thrombozyten. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß Peptidhormone wie Insulin und Glukagon, aber auch andere in künstlichen Medien nicht enthaltene Plasmabestandteile für den intakten Stoffwechsel und damit die intakte Funktion der Thrombozyten unentbehrlich sind. Ein zweiter Grund könnte sein, daß diese Autoren (BOOYSE und RAFELSON, 1967 b, 1968) möglicherweise nicht in flachen Schichten inkubierten. Die Thrombozyten, die nach den Untersuchungen von SCHNEIDER (1970) im Gegensatz zu früheren Arbeiten (GROSS et al., 1958; WALLER et al., 1959) ihren Energiebedarf überwiegend durch den oxydativen Abbau decken, werden dadurch in der Atmung beeinträchtigt und können demnach keine energiefordernden Prozesse mehr aufrechterhalten. Zum dritten sind die bei BOOYSE und RAFELSON (1967 b, 1968) üblichen Inkubationszeiten von maximal 90 min gerade unter den Bedingungen schlechter O_2-Versorgung wohl unzureichend gewesen, um eine RNA-Neusynthese ausschließen zu können.

Eine gute Demonstration der Gerichtetheit der Vorgänge in der intakten Zelle (mit dem höheren Energiepotential) gegenüber dem Homogenat bietet der Vergleich der Dünnschichtchromatogramme zum Nachweis der Uridin-Phosphorylierung. Im Versuch mit intakten Plättchen findet sich nach Inkubation eine Aktivitätsanreicherung im Bereich aller drei Uridinphosphate, im UTP-Bereich (gerade UTP wird für die RNA-Neusynthese benötigt) fast ebenso stark wie im UMP-Bereich. Im Homogenat-Versuch dagegen hat sich die Aktivität vornehmlich im UMP-Bereich angereichert, im übrigen lassen sich nur noch ein kleinerer Gipfel auf der Höhe der ADP-Bande (I) und ein schwacher, nicht exakt auflösbarer Gipfel im UDP- und UTP-Bereich nachweisen. Im Homogenat laufen also die Phosphorylierungsreaktionen viel weniger "zielgerichtet" ab als in intakten Thrombozyten.

Über die Beziehungen zwischen Stoffwechsel und Funktion bei den Thrombozyten ist sicher noch lange nicht das letzte Wort gefallen. Die vorliegende Arbeit mag auch als Anregung verstanden werden, den Thrombozyten, die ohne Zweifel eine zytologische wie biochemische Sonderstellung einnehmen, noch mehr Aufmerksamkeit zu widmen.

V. Zusammenfassung

Nach Inkubation von plättchenreichem Plasma mit Uridin-5-^{3}H konnte ein Einbau markierter Substanz in eine Nucleinsäurefraktion nachgewiesen werden. Für Thymidin ließ sich eine derartige Aktivitätsanreicherung in der höhermolekularen Fraktion nicht demonstrieren. Der Einbau des radioaktiven Uridins war gleichsinnig abhängig von der Plättchenzahl des verwendeten Plasmas sowie der Inkubationsdauer und konnte durch Actinomycin D gehemmt werden. Eine unspezifische Membranwirkung des Actinomycins ließ sich dabei ausschließen. Eine große Zahl von Einzelbestimmungen der Uridin-Einbaurate bei 16 gesunden Spendern erbrachte eine gute Übereinstimmung der Werte im Sinne der Normalverteilung. 2-Desoxy-D-glucose als kompetitiver Hemmer der Hexokinase vermochte den Einbau des markierten Uridins nicht zu beeinflussen, wohl aber den Einbau von Uracil-5-^{3}H. Die Uridin-Einbaurate wiederum ließ sich durch dibutyryliertes cAMP bis auf das 10-fache steigern. Die extrahierte höhermolekulare Fraktion, in die das markierte Uridin eingebaut wurde, erschien in der Gelchromatographie als meist nicht sehr distinkter Gipfel mit einem (durch Eichchromatographie ermittelten) Molekulargewicht vorwiegend im Bereich von t-RNA. Der durch die Aktivitätsanreicherung kenntliche höhermolekulare Peak ließ sich durch Inkubation mit

RNasen abbauen, was durch Rechromatographie am gleichen Gel demonstriert wurde. Der durch den enzymatischen Abbau entstandene niedermolekulare Gipfel erschien nicht in allen Versuchen im gleichen Molekülgrößenbereich.
In dünnschichtchromatographischen Experimenten - sowohl mit intakten Plättchen als auch mit Homogenat - konnte eine Uridin-Phosphorylierung in menschlichen Blutplättchen direkt nachgewiesen werden; nach Inkubation mit Uridin-5-^{3}H fand sich eine Aktivitätsanreicherung im Bereich aller drei Uridinphosphate. Eine Phosphorylierung von Thymidin konnte dagegen nicht demonstriert werden: sowohl im Versuch mit intakten Plättchen als auch mit Homogenat zeigte sich weder vor noch nach Inkubation mit markiertem Thymidin eine Aktivitätsanreicherung im Bereich der Thymidinphosphate. Auch für Orotsäure konnte eine, wenn auch geringe, Inkorporation in die Blutplättchen und Phosphorylierung bis zum UTP nachgewiesen werden.
Nach den beschriebenen Befunden läßt sich die Möglichkeit des Vorhandenseins mitochondrialer DNA in den Blutplättchen und demzufolge einer DNA-abhängigen Proteinsynthese nicht mehr ausschließen. In Anbetracht der Abhängigkeit der mitochondrialen DNA von den Genen des Zellkerns muß man daran denken, daß die fehlende Steuerung und Repression der DNA-abhängigen mitochondrialen Proteinsynthese infolge der Kernlosigkeit der Thrombo-

zyten für den ungewöhnlich hohen Gehalt der Plättchen an dem für alle Funktionen so bedeutsamen kontraktilen Protein verantwortlich sein könnte.

VI. Literaturverzeichnis

BALL, G., BRERETON, G. G., FULWOOD, M., IRELAND, D. M., YATES, P.:

Effect of prostaglandin E_1 alone and in combination with theophylline or aspirin on collagen-induced platelet aggregation and on platelet nucleotides including adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. Biochem. J. 120 : 709 (1970)

BETTEX-GALLAND, M. and LÜSCHER, E. F.:

Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombocytes. Nature (London) 184 : 276 (1959)

BIELKA, H.:

Molekulare Biologie der Zelle. Fischer, Stuttgart (1969)

BOOYSE, F. M. and RAFELSON, M. E. Jr.:

In vitro incorporation of amino-acids into the contractile protein of human blood platelets. Nature (London) 215 : 283 (1967) a

BOOYSE, F. M. and RAFELSON, M. E. Jr.:

Stable messenger RNA in the synthesis of contractile protein in human platelets. Biochim. Biophys. Acta 145 : 188 (1967) b

BOOYSE, F. M. and RAFELSON, M. E. Jr.:

Studies on human platelets I. Synthesis of platelet protein in a cell-free system. Biochim. Biophys. Acta 166 : 689 (1968)

BOOYSE, F. M., HOVEKE, Th. P., and RAFELSON, M. E. Jr.:

Studies on human platelets II. Protein synthetic activity of various platelet populations. Biochim. Biophys. Acta 157 : 660 (1968)

BORN, G. V. R.:

The breakdown of adenosinetriphosphate in blood platelets during clotting. J. Physiol. 133 : 61 (1955)

BORN, G. V. R.:

Adenosinetriphosphate (ATP) in blood platelets. Biochem. J. 62 : 33 (1956)

CAMPBELL, E. W., SMALL, W. J., and DAMESHEK, W.:

Metabolic activity of human blood platelets. J. Lab. Clin. Med. 47 : 835 (1956)

CAMPBELL, E., SMALL, W. J., LOPILATO, E., and DAMESHEK, W.:

Glycolytic intermediates of human platelets, their purification and identification. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94 : 505 (1957)

COOPER, I. A. and FIRKIN, B. G.:

Amino acid transport into human platelets and subsequent incorporation into protein. Thromb. Diath. Haemorrh. 23 : 140 (1970)

CORNEO, G., ZARDI, L., and POLLI, E.:

Human mitochondrial DNA. J. Mol. Biol. 36 : 419 (1968)

CREVELD, S. van, and PAULSSEN, M. M. P.:

Significance of clotting factors in blood platelets, in normal and pathological conditions. Lancet 2 : 242 (1951)

CREVELD, S. van, and PAULSSEN, M. M. P.:

Isolation and properties of third clotting factor in blood platelets. Lancet 1 : 23 (1952)

CROMBRUGGHE, B. de, PERLMAN, R. L., VARMUS, H. E., and PASTAN, I.:

Regulation of inducible enzyme synthesis in E. coli by cyclic adenosine-3':5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 244 : 5828 (1969)

FEISSLY, R., LÜDIN, H.:

Action de la cocaine sur les plaquettes sanguines. Helv. Physiol. Arch. 7 : 9 (1949)

GRANICK, S., GIBOR, A.:

The DNA of chloroplasts, mitochondria, and centrioles. Progr. Nucl. Acid Res. 6 : 143 (1967)

GREENE, R. W.:

Effect of pH on platelets and identification of ribonucleoprotein from platelets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87 : 412 (1954)

GROSS, R., LÖHR, G. W., WALLER, H. D.:

Zur Biochemie der Thrombozyten. Transact. 4th int. Congr. Biochem. (X. Symp.), Wien (1958)

GROSS, R. and SCHNEIDER, W.:

Energy metabolism. In: Shirley A. Johnson (Ed.): The Circulating Platelet. Academic Press, New York (1971)

HARBERS, E.:

Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1969)

KARLSON, P.:

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1970)

LÜSCHER, E. F.:

Die physiologische Bedeutung der Thrombozyten. Schweiz. Med. Wschr. 86 : 345 (1956)

LÜSCHER, E. F.:

Biochemische Eigenschaften und physiologische Bedeutung der Blutplättchen. Schweiz. Med. Wschr. 89 : 1021 (1959) a

LÜSCHER, E. F.:

Thrombozytenfaktoren. Ergebn. Physiol. 50 : 1 (1959) b

LÜSCHER, E. F.:

Thrombogenese. Helv. Med. Acta, Suppl. 50 : 5 (1970)

LÜSCHER, E. F. and BETTEX-GALLAND, M.:

Thrombosthenin. In: Shirley A. Johnson (Ed.): The Circulating Platelet. Academic Press, New York (1971)

MacMANUS, J. P., WHITFIELD, J. F.:

Stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis and mitotic activity of thymic lymphocytes by cyclic adenosine-3':5'-monophosphate. Exp. Cell Res. 58 : 188 (1969)

MARQUIS, N. R., VIGDAHL, R. L., TAVORMINA, P. A.:

Platelet aggregation I. Regulation by cyclic AMP and prostaglandin E_1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36 : 965 (1969)

MARQUIS, N. R., BECKER, J. A., VIGDAHL, R. L.:

Platelet aggregation III. An epinephrine induced decrease in cyclic AMP synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 : 783 (1970)

MAUPIN, B.:

Activité respiratoire des plaquettes sanguines de l'homme. C. R. Soc. Biol. (Paris) 148 : 439 (1954)

NASS, M. M. K., NASS, S., AFZELIUS, B. A.:

The general occurence of mitochondrial DNA.
Exp. Cell Res. 37 : 516 (1965)

PERLMAN, R. L. and PASTAN, I.:

Regulation of β-galactosidase synthesis in E. coli by cyclic adenosine-3':5'-monophosphate.
J. Biol. Chem. 243 : 5420 (1968) a

PERLMAN, R. L. and PASTAN, I.:

Cyclic 3':5'-AMP stimulation of ß-galactosidase and tryptophanase induction in E. coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 : 656 (1968) b

PERLMAN, R. L., CROMBRUGGHE, B. de, PASTAN, I.:

Cyclic AMP regulates catabolite and transient repression in E. coli. Nature (London) 223 : 810 (1969)

RANDERATH, K.:

A comparision between thin-layer chromatography and paper chromatography of nucleic acid derivatives.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 6 : 452 (1962)

ROBISON, G. A., ARNOLD, A., and HARTMAN, R. C.:

Divergent effects of epinephrine and prostaglandin E_1 on the level of cyclic AMP in human blood platelets.
Pharmacol. Res. Comm. 1 : 325 (1969)

ROUSLIN, W. and SCHATZ, G.:

Interdependence between promitochondrial and cytoplasmic protein synthesis during respiratory adaptation in baker's yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 1002 (1969)

SALZMAN, E. W. and NERI, L. L.:

Cyclic 3':5'-adenosine monophosphate in human blood platelets. Nature (London) 224 : 609 (1969)

SCHATZ, G. and SALTZGABER, J.:

Protein synthesis by yeast promitochondria in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 996 (1969)

SCHNEIDER, W.:

Untersuchungen zum Energiestoffwechsel menschlicher Blutplättchen. Habilitationsschrift, Köln (1970)

SCHNEIDER, W., LAMPE, K., SCHEURLEN, P. G.:

Untersuchungen zur Proteinsynthese menschlicher Blutplättchen. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77 : 400 (1971)

SCHWEYEN, R. and KAUDEWITZ, F.:

Protein synthesis by yeast mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 : 728 (1970)

SEITZ, I. F.:

Biochemistry of normal and leukemic leucocytes, thrombocytes, and bone marrow cells.
Advances Cancer Res. 9 : 303 (1965)

SHMERLING, Z. G.:

The effect of rifamycin on RNA synthesis in the rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 965 (1969)

STEINER, M. and BALDINI, M.:

Protein synthesis in aging blood platelets.
Blood 33 : 628 (1969)

STEINER, M.:

Platelet protein synthesis studied in a cell-free system. Experientia 26 : 786 (1970)

TEDESCHI, G. G., AMICI, D. e PAPARELLI, M.:

Sul contenuto in acidi nucleici delle piastrine.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 42 : 1139 (1966)

TULLIS, J. T.:

The platelets of human blood: their morphology, interaction and preservation. In: Blood cells and plasma proteins. New York (1953)

VIGDAHL, R. L., MARQUIS, N. R., TAVORMINA, P. A.:

Platelet aggregation II. Adenyl cyclase, prostaglandin E_1 and calcium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 : 409 (1969)

WAGNER, R. P.:

Genetics and phenogenetics of mitochondria.
Science 163 : 1026 (1969)

WALLER, H. D., LÖHR, G. W., GRIGNANI, F., GROSS, R.:

Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher Thrombozyten. Thromb. Diath. Haemorrh. 3 : 520 (1959)

WARSHAW, A. L., LASTER, L., and SHULMAN, N. R.:

Protein synthesis by human platelets.
J. Biol. Chem. 242 : 2094 (1967)

WHITE, J. G.:

The muscular system of blood platelets.
Blood 30 : 539 (1967)

WHITE, J. G.:

Ultrastructural physiology and cytochemistry of blood platelets. In: The Platelet, International Academy of Pathology Monograph, The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1971)

WHITFIELD, J. F., MacMANUS, J. P., GILLAN, D. J.:

Cyclic AMP mediation of bradykinin-induced stimulation of mitotic activity and DNA synthesis in thymocytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133 : 1270 (1970)

WILLEBRAND, E. A. von:

Hereditär pseudohämofili. Finska Läk. - Sällsk. Handl. 68 : 87 (1926), zit. nach: LANDBECK, G.: Thrombopathie v. Willebrand-Jürgens. Thromb. Diath. Haemorrh., Suppl. 24 : 157 (1967)

WOLFE, S. M. and SHULMAN, N. R.:

Adenyl cyclase activity in human platelets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 : 265 (1969)

WOODWARD, D. O. and MUNKRES, K. D.:

Alterations of a maternally inherited mitochondrial structural protein in respiratory-deficient strains of Neurospora. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 : 872 (1966)

ZIEVE, P. D., SOLOMON, H. M.:

Uptake of amino acids by the human platelet. Amer. J. Physiol. 214 : 58 (1968)

ZIEVE, P. D. and GREENOUGH, W. B.:

Adenyl cyclase in human platelets: activity and responsiveness.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 : 462 (1969)

Nachwort

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Schneider, leit. Oberarzt an der Medizinischen Universitätsklinik in Homburg/Saar, danke ich sehr herzlich für die Einführung in den Themenkreis und die methodische Unterweisung.

Außerdem möchte ich nicht versäumen, Herrn Professor Dr. med. P. G. Scheurlen, Direktor an der Medizinischen Universitätsklinik, für die großzügige Bereitstellung von Material und Geräten meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 25. Februar 1947 wurde ich als Sohn des techn. Zeichners Arthur Dries und seiner Ehefrau Irene, geb. Schneider, in Saarbrücken geboren. Vom Herbst 1953 an besuchte ich die Volksschule in Sitterswald/Saar und später in Saarbrücken-Burbach. Im Frühjahr 1957 wurde ich Schüler des Staatl. Ludwigsgymnasiums in Saarbrücken, das ich bis zur Reifeprüfung im Jahre 1966 besuchte. Vom 1.4.1966 bis zum 30.9.1967 leistete ich meinen Wehrdienst beim Bundesgrenzschutz in Ihringshausen bei Kassel und in Hünfeld bei Fulda. Zum Wintersemester 1967/68 nahm ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes auf und legte hier auch das Vorphysikum und das Physikum ab. Ende 1970 begann ich mit den der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten bei Professor Dr. med. Wolfgang Schneider in der I. Medizinischen Universitätsklinik in Homburg/Saar.